微生物学实验

（实验指导分册）

主摇摇编：闵摇航

参摇摇编：贾小明摇陈美慈摇马晓航

吴伟祥摇陈中云摇林小清

闵摇航

需要全本请访问 www.ertongbook.com

摇图书在版编目（悦CIP）数据

摇微生物学实验 辖刘航主编援-杭州：浙江大学出版社，
圆园员缘.员园
ISBN 978-7-308-14...-...

摇Ⅰ援微…摇Ⅱ援刘…摇Ⅲ援微生物学-实验
Ⅳ援Q93-33

摇中国版本图书馆 悦CIP）数据核字（圆园员缘）第 员...号

责任编辑摇杜玲玲摇唐桂礼
封面设计摇刘依群
出版发行摇浙江大学出版社
（杭州浙大路 猿缘号摇邮政编码 猿员园园圆苑）
（...）
（网址：...）
排摇摇版摇浙江大学出版社电脑排版中心
印摇摇刷摇浙江大学印刷厂
开摇摇本摇员园园园mm伊员猿缶园mm摇员辕猿缘
印摇摇张摇...
字摇摇数摇...千
版 印 次摇圆园员缘年 员月第 员版摇圆园员缘年 员月第 员次印刷
印摇摇数摇...-...
书摇摇号摇ISBN 978-7-308-14...-...
定摇摇价摇...元

前摇摇言

这本《微生物学实验指导》是在前三版（□□□□年第一版，□□□□年第二版，□□□□年第三版）的基础上，为进一步适应微生物学学科的发展和本科教学的实际需要，进行修改扩充编写而成的。全书分“实验指导”与“实验报告”两分册。实验指导共设□□个实验，系统包括了形态观察、操作技术和实际应用，内容涵盖了微生物学的形态、生理、生化、遗传育种、生态、环境、生物活性、系统发育、分子生态等不同方面；本书与由闵航主编的《微生物学》教材（浙江大学出版社，□□□□）的内容相配套，以适用于生物科学、生物技术、生物信息、应用生物学、农学类、环境微生物学等各个专业，使用时可根据不同专业的教学要求加以选择。

值本书正式出版之际，编者向为创建和编写本书中各个实验付出辛勤劳动的所有教师、实验管理人员，尤其是王献凤、陈浩军两位老师表示由衷的感谢。由于编者水平有限，不妥之处在所难免，请读者批评指正。

编□□者

□□□□年□月

目摇摇录

微生物学实验须知 …… Ⅰ

实验 员摇显微镜油镜的使用和细菌形态的观察 …… 员

实验 圆摇细菌的染色和细菌细胞构造的观察 …… 员圆

实验 猿摇放线菌和真菌形态的观察 …… 员苑

实验 源摇微生物细胞大小和数量的测定 …… 圆员

实验 缘摇微生物培养基的配制和灭菌 …… 圆缘

实验 远摇微生物的分离、培养和菌种保藏 …… 猿圆

实验 苑摇食用菌——平菇的栽培 …… 源圆

实验 愿摇甜酒酿的制作和酒药中糖化菌的分离 …… 源远

实验 怨摇微生物的生理生化反应 …… 源愿

实验 员园摇细菌纯培养生长曲线的测定 …… 缘圆

实验 员员摇噬菌体的培养及效价测定 …… 缘猿

实验 员圆摇根瘤菌质粒的快速检测 …… 缘远

实验 员猿摇细菌的紫外线诱变和营养缺陷型突变株的筛选 …… 缘愿

实验 员源摇土壤微生物区系的埋片观察法 …… 远猿

实验 员缘摇水质的细菌学检查以及空气中微生物的检测和计数 …… 远缘

实验 员远摇活性污泥中微生物的显微镜观察 …… 苑员

实验 员苑摇活性污泥或水稻土中甲烷形成活性的测定 …… 苑猿

实验 员愿摇豆科植物根瘤、根瘤细菌的形态观察及其分离 …… 苑缘

实验 员怨摇根瘤或土壤固氮酶活性的测定 …… 苑苑

实验 圆园摇环境条件对微生物生长的影响 …… 苑怨

实验 圆员摇用 *鼠伤寒沙门氏菌*组氨酸缺陷型回复突变试验法测定化学物质的致突变作用 …… 愿圆

实验 圆圆摇微生物对不含氮有机物和含氮化合物的转化作用 …… 愿源

实验 圆猿摇硝化作用强度的测定 …… 愿愿

实验 圆源摇分解果胶类物质微生物的检测 …… 怨园

实验 圆缘摇微生物乳酸发酵的观察 …… 怨员

实验 圆远摇液化型淀粉酶产生菌的分离与酶活性的测定 …… 怨猿

实验 圆苑摇蛋白酶产生菌的分离和蛋白酶活性的测定 …… 怨缘

实验 圆愿摇细菌分离菌株的分子生物学鉴定与系统发育分析 …… 怨苑

实验 圆怨摇土壤细菌群落多样性的 PCR-DGGE 或 T-RFLP 凝胶电泳分析 …… 怨怨

附　录摇微生物计数 配对 t 检验法统计近似表 …… 员园员

参考文献 …… 员园猿

微生物学实验须知

员爱进行微生物学实验前必须充分预习实验指导，明确实验目的、原理和方法，做到心中有数，以提高实验质量。

圆爱实验室中不得高声说话、谈笑、喧闹，尽量少走动，以保持严肃、安静、清洁的环境。

猿爱保持试验桌及地面的清洁，废纸、废棉花、培养物等应投入污物桶内，不得任意乱丢；严禁随意吐痰。

源爱注意安全，节约水电，爱护公物，尤其是显微镜等贵重仪器，要细心操作；如有损坏，应立即报告实验指导教师，并进行登记；凡属责任事故者，应按有关规定赔偿。

缘爱严格遵守操作规程，显微镜使用后应按要求擦洗干净，放置于原放置的柜内位置；认真进行无菌操作，灭菌物品和菌种不得随意开启，以免污染。

远爱实验中需进行培养的材料，应注明班级、组别、名称及处理方法，放于教师指定地点进行培养。

苑爱实验过程中如不慎将菌液或其他化学物溶液吸入口中，要及时用自来水反复嗽口；皮肤割破或烫伤要及时处理。

愿爱实验时要认真观察，用铅笔绘图，按时完成实验报告。

怨爱实验完毕，必须整理好实验桌上各种器材，并按原来的位置放置整齐；已用过的各种器皿应洗涤干净，放于指定位置。值日人员应将实验桌和地面打扫干净，经实验指导教师同意后方可离开。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

实验 员遥显微镜油镜的使用和细菌形态的观察

微生物的个体微小，肉眼难以见到，要研究它们，必须要用显微镜来观察。因此，显微镜是研究微生物的重要工具。显微镜是一种精密的光学仪器，使用时必须了解其基本原理和构造，才能充分发挥其性能。

一、目的要求

(员) 学习并掌握显微镜油镜的使用技术及维护的基本知识。
(圆) 使用油镜观察细菌的几种基本形态。
(猿) 用悬滴法在高倍镜或油镜下观察细菌的运动。

二、生物显微镜、相差显微镜及其油镜的使用原理

(一) 显微镜的结构与油镜的使用原理

员援显微镜的构造

图 员遥猿为单目普通显微镜，现已较少使用。其结构可分为两大部分：光学部分和机械部分。光学部分通常由接目镜、接物镜和照明装置（聚光镜、虹彩光圈、反光镜等）组成。它使检视物放大，形成物像，是显微镜的重要组成部分。机械部分由镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、载物台移动器、粗调节器、细调节器等部件组成。它起着支撑、调节、固定等作用。

圆援显微镜的放大倍数和分辨率

(员) 显微镜的放大倍数

显微镜放大物体，首先经过物镜第一次放大成像，再经过目镜在明视距离内第二次放大成像。因此，显微镜的放大倍数等于接物镜的放大倍数和接目镜放大倍数的乘积，即：

显微镜放大倍数 越 接物镜放大倍数 伊接目镜放大倍数

(圆) 显微镜的分辨率

显微镜的分辨率是表示显微镜分辨物体两端之间距离的能力，能够分辨物体两点间的距离

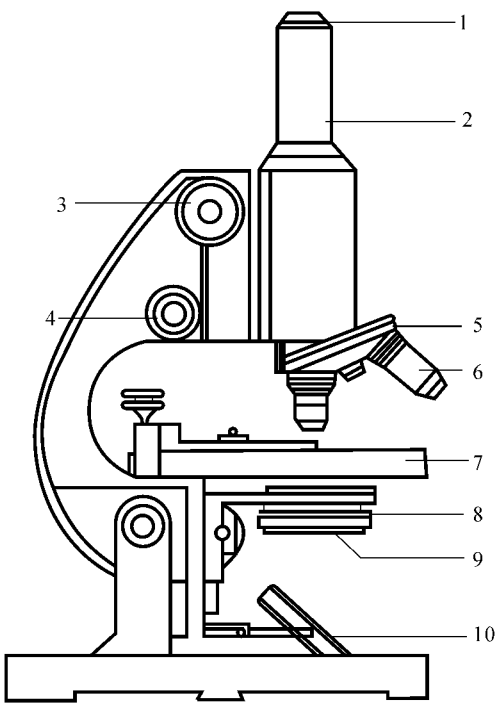


图 员遥猿遥普通光学显微镜结构示意图
员援接目镜；圆援镜筒；猿援粗调节器；源援细调节器
缘援转换器；远援接物镜；苑援载物台；愿援光圈
怨援聚光器；员园援反光镜

愈小，则分辨率愈高。分辨率的高低，首先取决于物镜的镜口率所使用光线的波长，见图 员-圆-圆

显微镜的分辨率可以用以下公式表示：

$$阅越 \frac{\lambda}{灶 \cdot 泽 \sin \frac{\alpha}{圆}}$$

式中 阅为物镜分辨出物体两点间的最短距离；

λ 为可见光的波长（平均 园.缘缘μ皂）；

灶为物镜和被检标本间介质的折射率；

α 为镜口角（即入射角）。

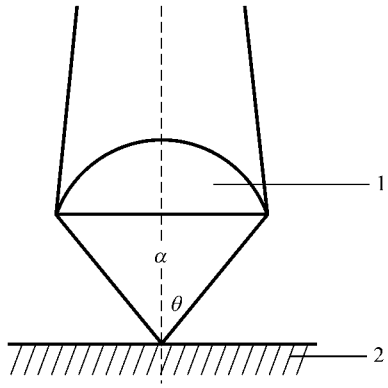


图 员-圆-猿 物镜的光线入射角

员.镜头；圆.载玻片

λ 愈大，阅值愈大，分辨率愈低，灶和 α 愈大，阅值愈小，分辨率愈高。因此，可以通过降低光线波长，增大介质折射率和加大镜口角（入射角）来提高分辨率。

猿.油镜使用的原理

对于个体微小，用高倍镜仍观察不清的微生物，则必须使用油镜。使用时，需要在标本和物镜间加入一种镜头油，如香柏油，所以叫油浸接物镜，简称油镜。

一般在镜头上有一黑圈或红圈的，表示为油镜物镜，也有的以“陨”或“与”字样来表示。由于油镜镜面很小，使用时检视物与镜面又非常靠近（工作距离很短），因而进入镜头的光线较少。当光线由反光镜通过玻片与镜头之间时，玻片与物镜之间的介质为空气（接物镜干燥系），空气折射率为 员，由于空气与玻片的密度不同，使光线受到折射，发生散射现象，结果进入物镜的光线必然减少，这样就降低了视野的照明度。若载玻片与物镜之间的介质不是空气，而是一层油质［一般常用香柏油，其折射率为 员.缘缘 与玻璃的折射率（员.缘圆 相近］，光线通过载玻片可直接通过香柏油进入物镜而几乎不发生折射（接物镜油浸系），使视野增加进光量，这样就能使物像更加清晰，见图 员-圆-源

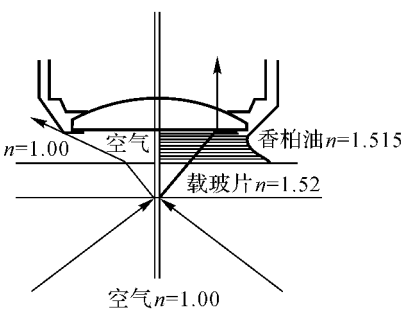


图 员-圆-源 干燥物镜与油浸系统物镜光线通路

（二）显微镜的一般使用方法（以油镜为例）

员.使用前检查

从显微镜箱中取出显微镜时，用右手拿镜臂，左手托镜座，直立移动，轻放在平稳的桌面上，然后检查各部零件是否齐全，镜头是否清洁，若有异常则即时报告老师。

圆.调节光照

正确的照明是获得良好检查效果的前提，用粗调节器提升镜筒，将低倍物镜旋到镜筒下方，使镜头和载物台距离为 缘皂皂左右，左眼看目镜，调节反光镜镜面角度（在天然的光线下观察，一般用平面反光镜；若以灯光为光源，则多用凹面反光镜）。调节光线强弱，然后调节聚光镜的位置（酌情升降），直至视野内得到最均匀最适宜的光度为止。

猿.低倍镜观察

低倍物镜视野面广，焦点深度较深，易于发现目标，确定观察位置，故应先用低倍镜观察

为宜。

将载片标本（涂面朝上）置于载物台的标本夹上，并将标本部位处于物镜的正下方，转动粗调节器，使镜头下降至镜面距离检视物大约 [illegible] 处。然后以左眼看目镜，一边观察视野，一边扭动粗调节器使镜头缓慢地升高，至视野内出现物像后，改用细调节器上下微微转动，仔细调节焦距和照明，直至视野内获得清晰的物像。选择适宜部位，移到视野中心，待换中、高倍镜观察。

[illegible]依次再进行中倍、高倍观察

在物镜依次由低倍至中倍、高倍的观察过程中，应逐次上升聚光镜以调节光线亮度，同样选择适宜的部位移至视野中央。

[illegible]油镜观察

将聚光镜提升至最高点，转动转换器，移开高倍镜，使高倍镜和油镜成“八”字形，在标本中央滴一小滴香柏油，使油镜镜头浸入香柏油中，微微转动细调节器至可见清晰物像 如果油镜上升已离开油面还未看清物像，则需要重新调节。此时可从侧面注视，用粗调节器将镜筒小心地降下，使油镜浸在香柏油中，其镜头几乎与标本相接。应特别注意不能压在标本上，更不能用力过猛，否则不仅压碎玻片，还会损坏镜头。用左手向上转动粗调节器，当视野中有模糊的标本物像时改用细调节器，直到看清物像为止。

[illegible]换片

另换新的标本片，必须从第 [illegible]条开始操作。

[illegible]用后必须清洁、复原

观察完毕，上旋镜筒，先用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用擦镜纸沾取少许二甲苯（香柏油溶于二甲苯）擦去镜头上的残留油迹，最后再用擦镜纸擦去残留的二甲苯。机械部件用细软布擦去灰尘和冷凝水，下降镜筒，将接物镜转成八字形置于载物台上。下降聚光镜（切勿使接物镜与聚光镜相碰受损），反光镜垂直于镜座。放进显微镜箱中锁好，并放入指定的显微镜柜中。

[illegible]显微镜保养和使用中的注意事项

① 不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。

② 镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布擦，以保证镜面的光洁度。

③ 观察标本时，必须依次用低倍镜、中倍镜、高倍镜，最后用油镜。当目视接目镜时，特别在使用油镜时，切不可用粗调节器向下旋，以免物镜碰到玻片损伤镜面或压碎玻片。

④ 观察时，两眼睁开，养成两眼能够轮换观察的习惯，以免眼睛疲劳，并且学会在左眼观察时，右眼注视绘图。

⑤ 拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜挪动。

⑥ 显微镜应存放在阴凉干燥处，以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

（三）[illegible]显微镜的使用方法

[illegible]显微镜的结构

[illegible]显微镜 [illegible]是目前实验室中微生物学实验所使用的双目显微镜，其结构示意图见图 [illegible]和图 [illegible]

[illegible]显微镜的使用方法

为了充分了解 [illegible]显微镜，更好地掌握这一精密仪器的性能及其使用方法，本实验对显微镜的结构及功能作较详细的介绍，指导教师作进一步的示范操作。因此，在使用时必须严格

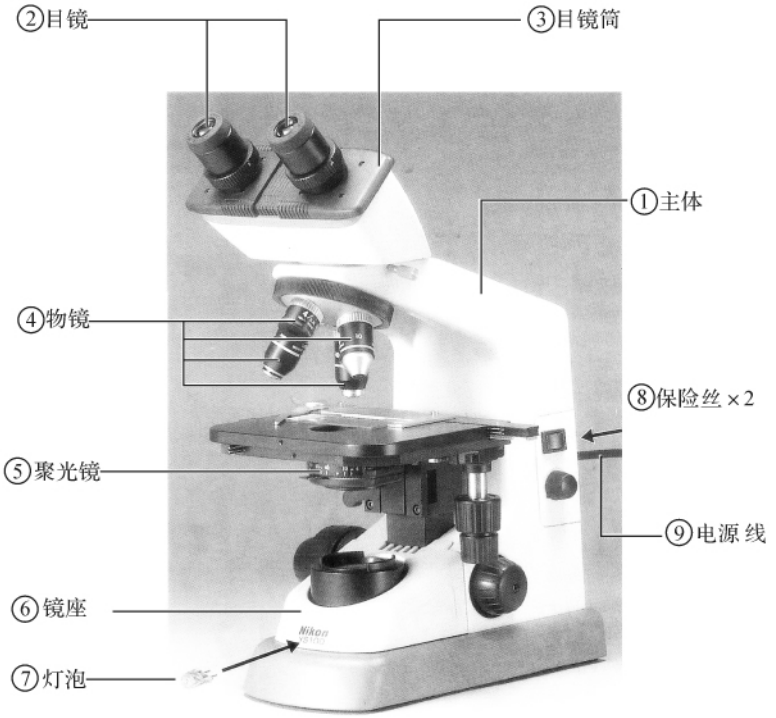


图 员源遥晕型臭虫显微镜的结构示意图 员

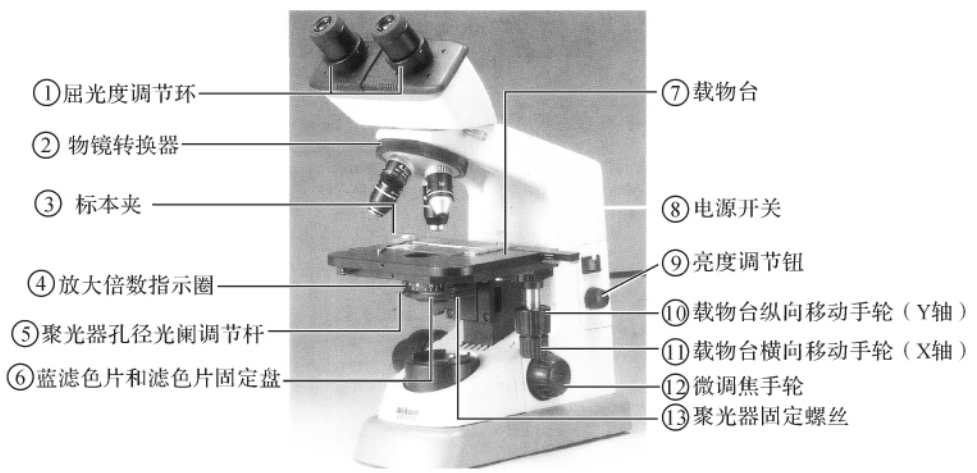


图 员源遥晕型臭虫显微镜的结构示意图 圆

地按本实验的操作规程进行操作。具体的操作步骤如下：

·源

摇摇① 接通电源。

② 打开主开关。

③ 移动电压调整旋钮，使光亮度适中。

④ 把标本固定在载物台上。

⑤ 放松粗调锁挡。

⑥ 用低倍物镜，旋转粗调和微调控制钮来进行对焦。

⑦ 调节双目镜筒间距和视度差。调节左右双目镜筒间距调节座，使其与视场合而为一。旋转左右目镜套筒，使镜长补偿环刻度的数值与双目镜筒间距的刻度相一致。一边旋转粗调、微调按钮，一边在标本上对焦。

⑧ 再适当调节照明亮度。

⑨ 使焦点正确地对准标本。

摇 锁紧粗调锁挡。

摇 调节孔径光栏，使视野亮度适宜。

摇 依次用低倍、中倍、高倍观察。

摇 油镜观察，移开高倍镜，在载玻片的标本中加一滴香柏油，旋转油镜至油液中，旋转微调控制钮，并将聚光镜调高与载片紧贴，即可见到清晰的物像。

摇 观察完毕，清洁、复原。

先将电压调整旋钮复原，关闭主开关，切断电源。放开粗调锁档。

油镜的处理：先用擦镜纸擦去镜头上的油，再用醮有二甲苯的擦镜纸擦镜头，最后用干净的擦镜纸将镜头擦干净。

摇 放入保存箱中。

（四）韵[illegible]生物显微镜

韵[illegible]生物显微镜是从日本进口的一种双目光学显微镜，它具有使用方便、分辨率高并且有立体感等优点，是研究微生物的良好工具。

员.显微镜的结构与性能

（员）显微镜的结构摇摇韵[illegible]生物显微镜的结构示意图见图 员-[illegible]和图 员-[illegible]，主要由双筒目镜、物镜、镜筒、镜架、转换器、机械载物台、载物台、聚光镜、底盘等组成。

目镜放大倍数为 员园伊摇员缘伊

物镜放大倍数为员园伊

圆园伊

源园伊摇摇弹簧加重

员园园伊　弹簧加重

（圆）显微镜操作部分的组成及其性能摇摇由插头、主开关、电压调整旋钮、载物台十字调节钮、夹紧器、微调控制钮、粗调控制钮、粗调控制钮的重量调节环、镜筒夹紧螺旋栓、双目镜筒间距的刻度、镜筒长补偿环、最低电压调节螺丝、保险丝支架及一次电压转换刻度盘和粗调锁挡等组成。

镜筒长补偿环是用来调节双目镜筒间距的刻度，补偿双目镜筒的视度差。

载物台十字调节钮可以前后左右调节。

电压调节旋钮用来调节显微镜的光度，随着数字增大电压随之增加，亮度也增大。粗调控制钮为重量调节环，如顺时针的方向旋转，则这重量调节环就变重。

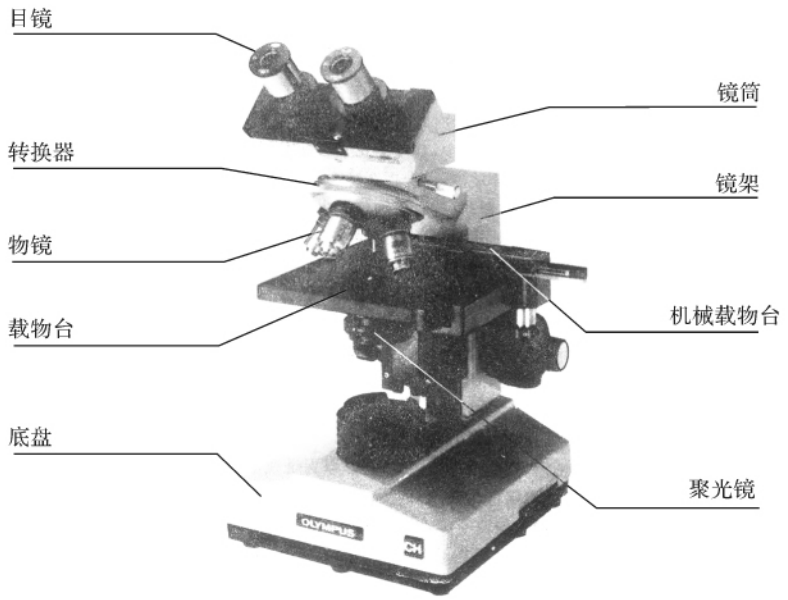


图 员圆遥 韵造耀型显微镜的结构示意图 员

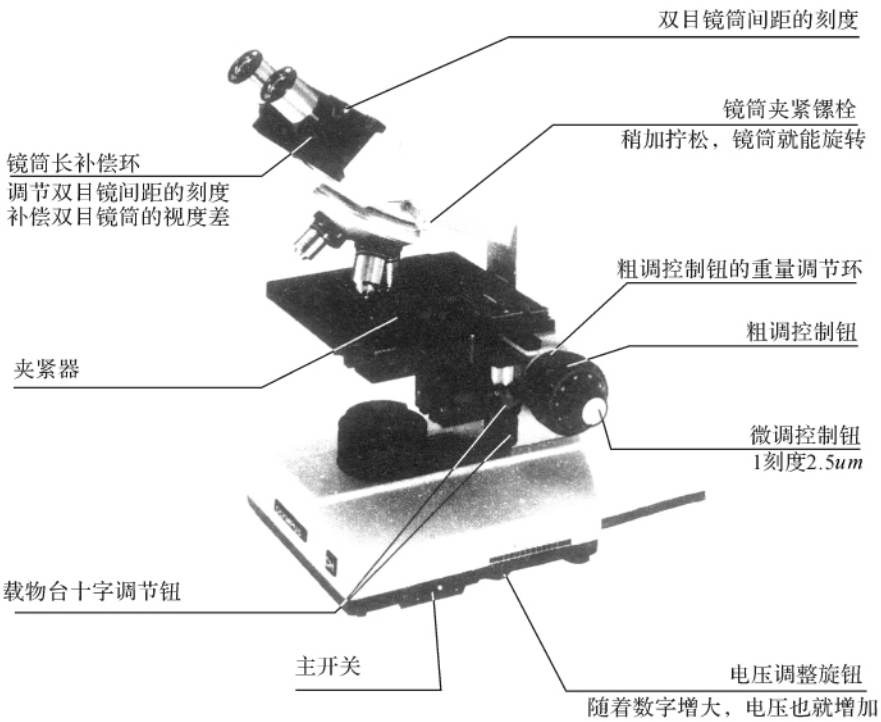


图 员圆遥 韵造耀型显微镜的结构示意图 圆

粗调锁挡是为了防止标本和物镜的碰撞，以及使对焦简单化的装置。用粗调控制或把焦点与标本对好后，固定这个锁挡，就能限制粗调下限。因此即使再度对焦点，也用粗调调至停止的位置，当焦点大致相合时，再改用微调控制钮调出正确的焦点。

一次电压转换刻度盘：用前必须把一次电压转换刻度盘与电源电压调成一致。

·远 需要全本请访问 www.ertongbook.com

圆爱显微镜的使用方法

使用方法与 晕翼粟显微镜的使用方法相似。

（五）韵酿差责怎相差显微镜

暗视野显微镜虽然可以看到活的微生物的轮廓，但是不能清楚地观察到内部结构，因为生物细胞的内部结构大部分都是透明的。相差显微镜则可以克服这方面的缺点。

员爱相差显微镜的工作原理

人的肉眼只能够分辨光波的波长（颜色）和振幅（亮度）的差异，而不能分辨光波相应的差异。微生物细胞经过染色后，可以看得更清楚，这是由于改变了光波的波长（有的也同时改变了振幅）。透明的物体不能改变光波的波长和振幅，只能使光波的相位发生改变。因此，在普通显微镜下，活细胞内的显微结构是不易看到的。

相差显微镜具有一个特殊的由环状光圈与聚光镜组合而成的转盘聚光镜，通过这个特殊的装置，就可把光波的相位差异变为振幅的差异，从而使人们能观察到活细胞的细微结构，并有立体的感觉。

在微生物研究工作中，经常应用相差显微镜来观察微生物的活细胞结构、鞭毛的运动等。

圆爱相差显微镜的装置

（员）环状光圈摇摇环状光圈装在显微镜的聚光镜下，使光线只能从环状部分形成一个空心圆筒状的光柱，再通过聚光镜照在载玻片的标本上。

（圆）相差物镜（具有环状相板）摇摇相差物镜是相差显微镜的主要装置。在物镜的后焦平面上加一相板，相板上涂一层物质（多为氯化镁等喷涂而成），使光波相对地提前或阻滞 员辕源波长。由于直射光的强度远远大于绕射光，即便是两者反向而发生干涉作用，其效果还是不够明显，所以要降低直射光的透光度，使相环呈暗色并使大约 圆豫的直射光通过。环状相板上的暗环与环状光圈上的亮环，大小是配合的，通过透明标本的直射光，一定要准确地经过环状相板的暗环，以减弱视野亮度，增进观察效果。

相差物镜常刻有红色的 责条样标记，责条是 责藻蒂藻（相）的缩写。韵酿差责怎相差物镜用红圈来代表相差物镜。

（猿）定中心望远镜（也称辅助目镜）摇摇这是一种工作距离长的低倍望远镜。使用时拔出目镜，安装在镜筒上端，调整环状光圈的中心使其与物镜的光轴完全在一直线上。

（源）辅助固定扳手。

（缘）绿色滤光片摇摇它的作用是使光源波长一致，增加干涉效果。

猿爱相差显微镜的使用方法

（员）相差装置的安装摇摇韵酿差责怎相差显微镜是将普通的生物显微镜的聚光镜拆下，然后把转盘聚光镜安装在聚光镜支架上，方位记号要向前，聚光镜的上透镜平面要和镜台平面一致。将绿色滤光片放在滤色镜座上。

（圆）相差物镜的安装摇摇将相差物镜由低倍、中倍、高倍、油镜按顺时针方向安装在转换器上。

物镜的放大倍数为员园伊

圆园伊

源园伊摇摇弹簧加重

员园园伊　弹簧加重

（猿）安放标本摇摇将标本安放在载物台上，并用夹紧器夹紧。

(源 对光摇摇先以相差物镜与普通目镜对光,旋转相差转盘至方位记号为“园”时停止,这时通光孔正位于聚光镜下面。使用低倍相差物镜,把标本移向视野中央,推动电压调整旋钮,调节光源亮度、高度和位置,以得到光亮均匀的视野。

(缘 调焦摇摇用粗调控制钮和微调控制钮调节焦点,至看清物像时为止。

(远 旋转相差转盘摇摇使环光圈的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应。例如,使用员园园倍相差物镜时,要在方位记号表示 员园园倍的位置停止旋转。

(苑 中心调节摇摇拔出普通目镜,插入定中心望远镜,一边看望远镜,一边旋转目镜镜筒使之升降,对准焦点就可看到清楚的亮环和暗环。再进行中心调节,如果两个圆环不能完全重合而有误差,则使用聚光器上左右侧的锁状螺旋——光环中心调节器,进行精密的调节,使两环完全重合。在调节过程中若亮环比暗环小而位于暗环内侧,此时可降低聚光镜 若亮环大于暗环时,可升高聚光镜,升到最高限仍不能矫正,则是载玻片过厚的缘故,需要更换较薄的载玻片。载片的厚度以 园[illegible]~ 员[illegible]为宜。

(愿 相差观察摇摇最后拔出定中心望远镜,插入普通目镜就可利用普通明视野的微检方法进行相差观察。每次更换标本或改变不同倍率的相差物镜时,都必须按上述方法重新调节中心,否则光轴不一致。

三、实验材料

① 显微镜(显微镜灯)、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。

② 细菌三种形态的染色标本。

③ 培养 员园~ 员愿澡的枯草杆菌([illegible]

④ 盖玻片、凹玻片、接种环、酒精灯。

四、实验程序

(一) 细菌三种基本形态的观察

识别细菌首先要从形态特征入手,细胞形态观察包括菌落形态和个体形态,这里主要是指个体形态的观察。细菌个体形态包括活细菌观察和涂片染色观察。在一般实验室条件下,常常用染色观察来识别细菌的形态。

① 结合油镜的使用,观察三张细菌染色片(球状菌、杆状菌和螺旋状菌),边观察边绘图。

② 用示范镜观察双球菌、四联球菌,并绘图。

(二) 细菌运动性的观察 (示范)

有些细菌具有鞭毛,它是运动器官,在水中能自由快速地运动。观察细菌的运动一般采用水浸片法、悬滴法、半固体培养法,通常用水浸片法和悬滴法来观察细菌的运动性。

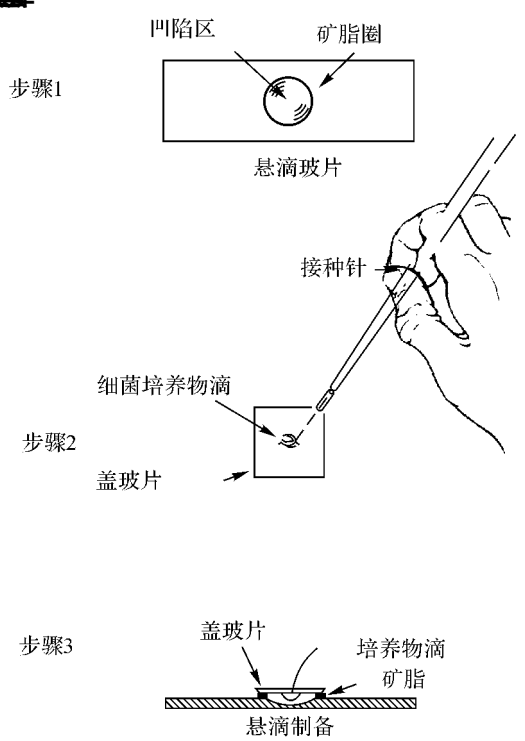


图 员[illegible]悬滴法观察细菌运动性

员爱水浸片法

用接种环取培养 员圆~ 员愿辕的枯草杆菌菌液一环，置于干净的载玻片中央，盖上盖玻片（注意不使产生气泡），用低倍镜确定部位后，再换用中倍至高倍或油镜观察。

圆爱悬滴法

取一洁净的盖玻片。按无菌操作要求，用接种环从斜面低部取培养 员圆~ 员愿辕的枯草杆菌菌液一环，置盖玻片中央（要求菌液保持为圆形突起的水珠）。另取凹玻片一块，在凹窝周围涂一圈凡士林，再将带菌液的盖玻片翻转，使液滴悬于凹玻片之凹窝处上方并避免菌液触及凹窝的边和底，略按盖玻片，使凡士林密封边缘以减少菌液蒸发，这样可以保持较长时间观察。见图 员愿遭悬滴片制成后，先用低倍镜找到水滴，再换高倍镜观察。用此法可以区别细菌的运动性，也可用于观察细菌的繁殖方式、孢子发芽等。

思 考 题

员爱油镜与普通物镜在使用方法上有何不同？应特别注意些什么？

圆爱使用油镜时，为什么必须用镜头油？

猿爱镜检标本时，为什么先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

实验 圆摇细菌的染色和细菌细胞构造的观察

染色是观察微生物的一种重要方法。由于微生物细胞含有大量水分，一般在 愿缘 ~ 怨缘以上，对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大，与周围背景没有明显的明暗差。所以，除了观察活体微生物细胞的运动性和直接计算菌数外，绝大多数情况下都必须经过染色后，才能在显微镜下进行观察。

一、目的要求

① 学习微生物涂片、染色的基本技术和无菌操作技术。
② 掌握细菌的一般染色法和革兰氏染色法。
③ 进一步掌握显微镜油镜的使用技术。
④ 观察和识别细菌细胞的特殊构造。

二、染色剂和染色的原理

微生物染色的基本原理，是借助物理因素和化学因素的作用而进行的。物理因素如细胞及细胞物质对染料的渗透、吸附作用等。

细菌的等电点较低 (责圆~缘)，故在中性、碱性或弱酸性溶液中，菌体蛋白质电离后带负电荷，而碱性染料电离时染料离子带正电荷。因此，带负电荷的细菌常和带正电荷的碱性染料进行结合，所以在细菌学实验室中常用碱性染料进行染色。

染色剂是一种供染色用的有机化合物，目前普遍采用的染色剂是含有苯环的有机化合物。染料分子都由苯环和连接在苯环上的染色基团 (或称呈色基团，色基) 和助色基团 (或称作用基团) 三部分组成。助色基团具有电离特性，电离后带有正或负电荷的染料离子便能与细胞进行较牢固的结合，使其呈现颜色。

染料可按其电离后染料离子所带电荷的性质分为酸性染料、碱性染料、中性 (复合) 染料和单纯染料四大类。

(员) 酸性染料摇摇这类染料电离后染料离子带负电荷，如酸性复红、刚果红、伊红、藻红、苯胺黑等，它们可与碱性物质结合成盐。

(圆) 碱性染料摇摇这类染料电离后染料离子带正电荷，它可与酸性物质结合成盐。微生物实验室一般常用的碱性染料有碱性复红、中性红、孔雀绿、番红、结晶紫、美蓝、甲基紫等。在一般情况下，细菌易被碱性染料染色。

(猿) 中性 (复合) 染料摇摇酸性染料与碱性的结合物叫做中性 (复合) 染料，如伊红、美蓝、瑞脱氏 (宰则蒂斯) 染料和基姆萨氏 (员匝姆萨) 染料等，基姆萨氏染料常用于细胞核的染色。

(源) 单纯染料摇摇这类染料的化学亲和力低，不能和被染的物质生成盐，其染色能力视其是否溶于被染物而定。它们大多数属于偶氮化合物，不溶于水，但溶于脂肪溶剂，如苏丹类

(杂遭的染料。

微生物染色常用的染料如表 圆所示。

表 圆各种染料的特性与用途

染料名称	特性			用途
结晶紫 (龙胆紫) (碱性	对位醌	一	革兰氏染色等
番红 (沙黄) (碱性	双偶氮	一	革兰氏染色、核染色
碱性复红 (品红) (碱性	对位醌	一	核染色、鉴别结核杆菌
美蓝 (碱性	对位醌	一	活体染色、放线菌染色、氧化还原指示剂
刚果红 (酸性	双偶氮	一	细菌负染色,酵母菌染色
孔雀绿 (碱性	对位醌	一	细菌芽孢染色
苦味酸 (酸性	一	一	染真菌细胞群,海藻细胞壁
伊红 (曙红 再 (酸性	对位醌	一	细胞质染色,细胞的嗜酸性颗粒染色
藻红 (兰光赤星) (酸性	对位醌	一	染土壤细菌
酸性复红 (品红) (酸性	对位醌	一	单染色等
中性红 (碱性	醌	一	活体染色、指示培养基,鉴别肠道细菌等
亮绿 (大皇绿) (碱性	对位醌	一	细菌、螺旋体等的染色,鉴别培养
苏丹 Ⅲ (三号 苏丹红) (杂遭 Ⅲ)	酸性	双偶氮	一	脂肪染色
荧光素 (云	酸性	羰基	一	荧光染色
黑素 (水溶黑素) (混合物			负染色用

三、实验材料

员爱涂片染色用的细菌培养物

① 大肠杆菌 (的斜面培养物。

② 枯草杆菌 (的斜面培养物。

圆爱器材

载玻片、接种环、镊子、酒精灯、各种染色液、火柴、无菌牙签、玻璃铅笔、蒸馏水、显微镜、镜头油、擦镜纸、吸水纸、二甲苯等。

猿爱示范片

① 苏云金芽孢杆菌 (的芽孢。

② 胶质芽孢杆菌 (的荚膜。

③ 枯草芽孢杆菌的鞭毛。

四、实验程序

(一) 细菌染色的方法

染色的方法一般分为简单染色法 (又称一般染色法) 和复染色法 (又称特殊染色法) 两种。简单染色法是用一种染色液染色菌体后,就可以观察微生物的大小、形状和细胞排列状况,但不能鉴别微生物以及它的特殊构造等。复染色法是用两种或两种以上染色液进行染色,有协助鉴别微生物的作用,故也称鉴别染色法。常用的复染色法有革兰氏染色法和抗酸性染色法,

还有鉴别细胞各部结构的如芽孢子染色法、荚膜染色法、鞭毛染色法、细胞核染色法等特殊染色法。

(二) 细菌染色的方法和步骤

微生物染色技术的一般过程如下：

涂片 → 干燥→ 固定 → 染色 → 媒染 → 脱色 → 复染 → 水洗 → 干燥 → 镜检。

员援简单染色法 (一般染色法)

(员 菌种摇摇牙垢细菌。

(圆 涂片摇摇取洁净无油污的载玻片一块，在玻片中心加一小滴蒸馏水，用无菌牙签取牙垢少许，涂于玻片的水滴中，并涂成直径约为 员~圆 的均匀薄层，用过的牙签应立即投入废物桶。

(猿 干燥摇摇让涂片自然风干或将涂面朝上在酒精灯上方微微加热，使水分蒸发但切勿紧靠火焰或加热时间过长，以防标本烤焦变形。

(源 固定摇摇将已干燥的涂片之涂面朝上，在酒精灯火焰外层尽快地来回通过 圆~猿次，杀死微生物，固定细胞结构，以便染色。待玻片冷却后再加染色液。

(缘 染色摇摇将涂片置于水平位置上，在整个涂面上滴加齐氏石碳酸复红染色液，染色员~缘分钟左右。通常，染色时间的长短取决于菌体、染色液的种类和浓度。

(远 水洗摇摇染色时间一到，倾去染色液并用自来水细流冲洗涂片，洗至流下的水中无染料颜色为止。

(苑 干燥摇摇在空气中自然干燥，也可用吸水纸吸去载玻片上的水，但应注意不能将滤纸在涂面上拖擦。

(愿 镜检摇摇干燥后的载片标本可用显微镜观察，从低倍到油镜，在油镜下观察牙垢中的各种细菌形态，并绘出典型的视野图。

圆援革兰氏 (革兰染色) 染色法

革兰氏染色法是复 (特殊) 染色法中一种最重要的鉴别性染色法。该法是员愿愿源年由丹麦病理学家 革兰氏所创立，最初是作为观察组织切片中细胞之用，后因其可将所有的细菌区分为差别明显的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类，从而成为检验细菌中最常用的鉴别染色方法。

该染色法是先将细菌用结晶紫染色，再加媒染剂碘液媒染以增加染料和细菌细胞的亲和力，使碘液和结晶紫在菌体细胞壁部位形成相对分子质量较大的紫碘复合物，而后用脱色剂酒精或丙酮脱色，最后再用复染剂番红复染。如果细菌经脱色剂酒精或丙酮处理后不被脱色而保存初染颜色即紫色，即为“革兰氏阳性菌”；若初染被脱色而染上复染剂番红颜色即淡红色，则为“革兰氏阴性菌”。

革兰氏阳性细菌——紫色，也写作 革+；

革兰氏阴性细菌——红色，也写作 革-。

革兰氏染色法一般包括初染、媒染、脱色、复染等四个步骤，但在具体操作方法上有多种做法。

(员 涂片摇摇取一块洁净的载玻片，用特种铅笔在载片的左右侧注上菌号，并在载片两端各滴一滴蒸馏水。将接种环在火焰上灼烧灭菌，以无菌操作法 (图 圆-员) 在 员号菌 (见实验材料) 菌苔上挑取菌体少许 (注意不要挑起培养基)。放在载玻片一端的水滴中，涂成均匀的薄层，接种环使用后必须立即经再次火焰灭菌，才可放下。再用经火焰灭菌过的接种环取 圆号菌

需要全本请访问 www.ertongbook.com